

# Thymus dependent autoimmunity : thymic selection versus peripheral tolerance in the model of experimental Cyclosporin-A induced autoimmunity

Citation for published version (APA):

Beijleveld, L. J. J. (1996). *Thymus dependent autoimmunity : thymic selection versus peripheral tolerance in the model of experimental Cyclosporin-A induced autoimmunity*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Rijksuniversiteit Limburg. <https://doi.org/10.26481/dis.19960920lb>

## Document status and date:

Published: 01/01/1996

## DOI:

[10.26481/dis.19960920lb](https://doi.org/10.26481/dis.19960920lb)

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

Download date: 05 May. 2023



## Summary

Cyclosporin-A induced autoimmunity is an experimental model of disease that can be readily induced in young Lewis rats. This model is discussed in **Chapter 1**, in the context of intra-thymic T cell development, including positive and negative selection, and peripheral tolerance versus autoimmunity. The most conspicuous target organ in this model is the skin; its acute and subacute pathology includes, in chronological order, erythroderma (reddening of the skin), dermatitis (inflammation of the skin seen as a brownish discolouring), and alopecia (severe hair loss). This pathology has striking similarity with Graft-versus-Host disease (GvH), a disease observed after transplantation of allogeneic bone marrow into immuno-compromised recipients. The development of GvH-like pathology in this experimental model is remarkable because the disease is induced by procedures which are used to prevent GvH in man after bone marrow transplantation (BMT). Those procedures in man are firstly the use of allogeneic but fully matched major histocompatibility complex (MHC) marrow, and secondly, Cyclosporin-A therapy. Cyclosporin-A (CsA) is an immunosuppressive drug used clinically to prevent allograft rejection, to suppress ongoing autoimmune diseases and to prevent GvH after allogeneic BMT.

Although the GvH-like disease in Lewis rats resembles clinically GvH seen in man after BMT, the animal disease is not caused by mismatches for major or minor histocompatibility complex antigens. In the rat model, disease is brought about by total body irradiation of 8.5 Gy followed by a syngeneic (MHC identical) BMT; next CsA is given for a 4 to 6 week period. After stopping CsA, disease develops in the susceptible Lewis strain. In the rat model, syngeneic BMT is not necessary since disease also develops when a hindleg of the rat is shielded during X-irradiation, and thereby allows rescue by autologous bone marrow reconstitution. This observation led to two conclusions. First, the GvH-like disease in the rat could not be due to MHC mismatches and was therefore of an autoimmune nature; hence the disease is called CsA autoimmune disease (CsA-AI). This description is not quite correct either, because CsA given for a 6 week period does not cause disease when the rat is not conditioned by prior X-irradiation. The second, and as we will show 'erroneous', conclusion

was that the thymus had to be in the field of X-irradiation. This conclusion was supported by the fact that CsA-AI is thymus dependent: thymectomy prior to X-irradiation and CsA-therapy prevents disease and autoreactive, thymus derived T cells are the effector cells as shown by adoptive transfer studies. These adoptive transfers are only successful, however, when the auto-regulatory (T) cells in the recipient are first eliminated by X-irradiation or Cyclophosphamide administration. It is clear then, that for disease to develop one needs not only the generation of autoreactive thymic derived T cells, but also suppression or modulation of a peripheral regulatory T cell circuit. In this thesis we have examined both the events in the thymus and in the periphery.

In **Chapter 2**, we first asked the question at which point in time the autoreactive T cells leave the thymus. In order to address this question serial thymectomies were performed in rats, subjected to total body X-irradiation (8.5 Gy), with a rescue with  $6 \times 10^7$  syngeneic bone marrow cells, and next given CsA (7.5 mg/kg/day) for up to 6 weeks. When not thymectomized, these rats develop, 2 to 3 weeks after cessation of CsA, CsA-AI. Thymectomies performed within 8 days of X-irradiation prevented CsA-AI. Thymectomies performed on day 12 or thereafter allowed development of disease. However, incidence and severity increased between day 12 and 21 thymectomies. From day 21 on, no further increase in severity and incidence was observed. Thus within 2 weeks after X-irradiation, the thymus is repopulated and autoreactive cells have moved into the periphery under CsA-therapy, and indeed continuation of CsA treatment for up to 6 weeks after thymectomy did not influence disease. We next asked the question whether or not the thymus had to be in the field of X-irradiation. For this purpose, Lewis rats were first thymectomized; they were next X-irradiated (8.5 Gy), given syngeneic bone marrow cells, two syngeneic neonatal thymus lobes transplanted under the renal capsule, and CsA. These rats develop CsA-AI after cessation of CsA medication given for 4 or 6 weeks, showing that the thymus is necessary -without transplantation of thymic lobes no disease develops- but X-irradiation of the thymus is not required.

Given that X-irradiation of the thymus is not required to bring about disease we next asked the question in **Chapter 3** how CsA brings about thymus derived autoreactive T cells into the periphery. CsA has been shown to interfere with intrathymic selection. This -the literature holds- is due to a disappearance of the MHC class II antigens in the thymic dendritic cells, or alternatively, due to a decrease of these dendritic cells altogether; either way resulting in defective negative selection. This, at any rate, was assumed to explain the appearance of "forbidden" T cells (in terms of T cell receptor (TCR)  $\beta$ -chain variable region (BV) usage) into

the periphery of mice treated with CsA. In order to address this question, Lewis rats were treated with CsA and/or X-irradiation. The effect of treatment on thymic stromal cells (including dendritic cells), and thymocyte population was examined in terms of histology, immunohistochemistry and thymocyte phenotype by means of tricolour staining of the thymocytes followed by flowcytometric analysis. Using fluorescent labeled monoclonal antibodies (mAb) to CD4, CD8 and TCR $\alpha\beta$ , the thymocyte population can be divided into cortical (relatively immature) CD4CD8 double positive (DP) TCR $\alpha\beta$ <sup>intermediate</sup> expressing cells, and medullary (more mature) CD4 or CD8 single positive (SP) cells which are TCR $\alpha\beta$ <sup>high</sup>. X-irradiation followed by syngeneic BMT resulted in a severe depletion of thymocytes, but the thymus had returned to normal in terms of all parameters mentioned above in a 2-week period. A different picture emerged when CsA (7.5 mg/kg/day) was added to this regimen. First, CsA by itself, or given after prior X-irradiation and syngeneic BMT, caused a remarkable decrease in size of the medulla of the thymus (involution), including a decreased number of medullary dendritic cells without, however, influencing their expression of MHC class II antigens; and although the medulla has decreased remarkably in size, the antigen distribution and density of the remnant epithelial cells and dendritic cells did not differ from normal.

CsA treatment led also to a sharp decrease in CD4 and CD8 SP thymocytes, brought about by a maturation arrest of the cortical CD4CD8 DP thymocytes. The combination of X-irradiation and CsA allowed a recovery of cortical thymocytes but not of the medullary ones. These observations were inconsistent with the notion that the appearance of peripheral autoreactive and thymic derived T cells in CsA-AI was due to an altered thymic medullary microenvironment.

We therefore asked the question in **Chapter 4** whether or not CsA influenced the function of the thymic dendritic cells. For this purpose CsA, in doses of 7.5 to 30 mgr/kg/day, was given to Lewis rats for a 2 week period; next the number and function of the thymic dendritic cells was measured *in vitro* in terms of accessory function and capacity to induce allogeneic lymphocyte proliferation. CsA decreased the number of dendritic cells; but these cells were entirely normal in terms of membrane antigens, accessory cell activity and capacity to induce allogeneic T cell-proliferation. These results are incompatible with the view that CsA selectively interferes with thymic dendritic cells. They support rather the view that the medullary involution is secondary to a maturation arrest of the cortical thymocytes. Since the integrity of the medulla requires the presence of mature thymocytes, in the absence of an inflow of SP thymocytes into the medulla, involution of the medulla occurs.

Although autoreactive T cells apparently are thymus derived, CsA alone does not induce disease. Peripheral mechanisms for tolerance induction are additionally involved in CsA-AI. This indicates that CsA-AI is principally due to a failure of peripheral T cell regulation and suppressor circuits. Therefore we turned from the thymus to the periphery.

Peripheral T helper (Th) cell-dependent immune responses develop into Th1 or Th2 responses. The difference between these two is made on the basis of secreted cytokines. The Th1 response includes the delayed type hypersensitivity reaction and is characterized by the secretion of interleukin 2 and interferon  $\gamma$ , whereas the Th2 response uses other cytokines, e.g. IL4 and IL10, and provides B cell help. It has now become clear that preponderance of Th2 cells may suppress Th1 responses, and the reverse, and that this effect is brought about by cytokines. In addition, it is postulated that in Th cell mediated autoimmune models, a skewing of peripheral T cells in favour of Th2 may prevent disease, and the reverse facilitates it. In the model of CsA-AI the peripheral skin lesions appear histologically to be Th1 (delayed type hypersensitivity) mediated.

In **Chapter 5** we determined the thymus dependent, peripheral T cell maturation in relation to development of CsA-AI. Thymic output can be assessed by determining the number of Thy1.1<sup>+</sup> (a marker for young, *i.e.* less than 14 days old, rat T cells) TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> recent thymic emigrants (RTE). X-irradiation induced a peripheral T cell depletion completely reversed in a 6 week period. CsA caused a decrease in RTE which was also observed in rats subjected to X-irradiation with syngeneic bone marrow rescue and CsA therapy; the latter showed decreased numbers of T cells until CsA-AI; CD4 and CD8 T cells were equally decreased. In CsA-AI rats, however, TCR $\alpha\beta$ <sup>-</sup> cells were observed expressing CD4, CD8 or both. The majority of the CD8<sup>+</sup> TCR $\alpha\beta$ <sup>-</sup> cells were identified to be NK cells. The CD4<sup>+</sup> and CD4CD8 DP TCR $\alpha\beta$ <sup>-</sup> cells were demonstrated to be mostly monocytes as defined by the expression of CR3.

In order to be informed about Th1 and Th2 subset distribution, the CD45RC and RT6 antigens were used; in rats Th1-like cells are postulated to carry the marker CD45RC but lack RT6, whereas Th2-like cells show the reverse. Lewis rats developing CsA-AI, showed a marked and persistent relative expansion of mature Th1-like cells (CD45RC<sup>+</sup>, RT6<sup>-</sup>) resulting in a reversal of the Th1:Th2 ratio in favour of the CD45RC<sup>+</sup>, RT6<sup>-</sup> Th1-like cell subset; in Brown Norway rats, which are resistant to induction of CsA-AI, the ratio of Th1:Th2 cells did not reverse. Lewis rats subjected to either X-irradiation or CsA therapy did not show increases of Th1 comparable to CsA-AI. We demonstrated that the CD45RC<sup>+</sup>, RT6<sup>-</sup> Th cells isolated from normal Lewis rats produced IL2 mRNA, and moreover, constituted the only Th subset producing interferon  $\gamma$  mRNA on stimulation, indicating their Th1 nature. Altogether, this

suggests that susceptibility or resistance to CsA-AI requires, apart from thymic derived autoreactive T cells, a skewing of the Th1:Th2 balance in favour of Th1.

In **Chapter 6** we have addressed the issue of the autoreactive T effector cells, and their TCR BV-repertoire, in adoptive transfer studies. The literature on this issue is conflicting since by means of adoptive transfer studies the disease has been transferred with CD4 cells by some, by CD8 cells by others, whereas again others claimed the requirement of both CD4 and CD8 cells. There is consensus that the recipient needs to be conditioned by X-irradiation or Cyclophosphamide treatment; adoptive transfers with T cells, derived from Lewis rats with acute CsA-AI, into normal Lewis rats does not yield disease. The autoregulatory T cell circuit of the recipient has to be first deleted.

To determine the efficacy of autoreactive CD4 and CD8 T cells, the adoptive transfer studies were carried out in a well defined experimental protocol. For this purpose the recipient rats were first thymectomized, next X-irradiated and given syngeneic marrow; by this manoeuvre the adoptively transferred cells could not be contaminated by new thymic output of the thymus of the recipient. Next, lymph nodes of animals with CsA-AI were harvested, prepared into single cell suspensions, depleted of either CD4 or CD8 cells, and were next infused intravenously into the recipient; when CD4 T cells were adoptively transferred the recipient received also *in vivo* depleting mAb to the CD8 subset, and when CD8 T cells were transferred mAb to CD4 was given. After adoptive transfer, when the rats developed disease, the transferred cells were monitored by flowcytometry of peripheral blood and skin biopsies were taken for immunohistologic analysis. CsA-AI developed after adoptive transfer of either CD4 or CD8 T cells in the absence of the depleted subset. Both CD4 and CD8 transfers caused similar lesions with similar kinetics. The enhanced MHC class II expression on keratinocytes, and the presence of ED1<sup>+</sup> macrophages was identical to the lesions observed in the primary donors. The difference was that in the primary donor the skin lesions contain both CD4 and CD8 T cells, whereas in the lesions from adoptive transfers either CD4<sup>+</sup> TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> cells or CD8<sup>+</sup> TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> cells were present. These results show that phenotypically completely different T cell subsets cause identical lesions: in other words, dissociation of presumed phenotype-related function and *in vivo* biological effect. How this is brought about is entirely speculative.

We analysed in addition the TCR repertoire in terms of the BV-usage. This revealed the patterns of TCR BV expression in the lymph node cells from rats with CsA-AI and recipients of adoptive transfer (developing disease in the absence of either CD4 or CD8 T cells) to be comparable to that of normal Lewis thymocytes or lymph node cells. Also the epidermal T cell infiltrates in recipients of adoptively transferred cells showed no preferential use of TCR BV

families. These results do not support the view that CsA-AI results from a peripheral expansion of T cell populations in terms of TCR BV usage.

The work presented in these chapters may be shortly summarised as follows.

CsA-AI is the result of aberrant T cell development after X-irradiation and CsA therapy. CsA has a clearcut effect on thymic architecture and thymocyte maturation; a decrease in the number of mature thymocytes and, secondary to this effect, involution of the medulla. Although all stromal cells are still present and seem to be able to provide the micro-environment that is important for negative selection, upon CsA therapy autoreactive thymocytes are generated. CsA acts directly on the thymocytes, by interfering with the intra-cellular signal upon activation via the TCR, and thereby altering the fate of the thymocytes during maturation. Because of impaired selection, among the thymocytes that have survived both positive and negative selection, the frequency of autoreactive thymocytes is increased.

X-irradiation is obligatory to condition the periphery. Provided the periphery is void of regulatory cells, CsA-AI can develop. Already during CsA therapy, thymus derived autoreactive T cells enter the periphery, and after CsA therapy is stopped, CsA-AI will develop. Autoreactive T cells are demonstrable in lymph nodes, spleen and in the lesions. Expansion of CD45RC<sup>+</sup>, RT6<sup>-</sup>, Th1-like cells is critical for CsA-AI to develop. Whether or not this will occur is genetically controlled. Activation of the Th1-like cells results in IL2 and IFN $\gamma$  production, which in addition may lead to further skewing of other T cells, including CD8 T cells, to respond in a similar fashion. When disease is clinically manifest, effector T cells are demonstrable within the CD4 and CD8 T cell population by adoptive transfer. There is no evidence for restricted usage of any TCR BV family. The antigen in CsA-AI is unknown, but both CD4 and CD8 T cells populations contain effector T cells. Since virtually all Lewis rats, subjected to X-irradiation and CsA therapy develop similar disease it is suggested that the auto-antigen(s) are related to epithelial cell antigen(s) expressed in the thymus and in the skin.



## Samenvatting

Cyclosporine A-geïnduceerde autoimmunitet is een model voor autoimmuunziekte in mens en proefdier en het kan op eenvoudige wijze gegenereerd worden in de Lewis rat. Dit model wordt beschreven in **Hoofdstuk 1**, in de context van de intrathymale T cel ontwikkeling, welke positieve en negatieve selectie omvat, en perifere tolerantie versus autoimmunitet. Het meest in het oog springende doelwit-orgaan in dit model is de huid; de acute en subacute huidpathologie omvat in chronologische volgorde erythroderma (intense roodverkleuring van de huid), dermatitis (ontsteking van de huid, gekenmerkt door een bruinverkleuring) en alopecia (kaalheid door haarverlies); en wanneer de ziekte chronisch wordt is deze niet te onderscheiden van cutane humane scleroderma in histologische zin. Deze pathologie toont grote overeenkomst met de Graft-versus-Host reactie (GvH), een fenomeen dat wordt waargenomen bij immuun-deficiënte ontvangers na allogene beenmergtransplantatie. De ontwikkeling van de GvH-achtige pathologie in dit experimentele model is op het eerste gezicht zeer opmerkelijk. Immers dit model wordt geïnduceerd onder condities die bij de mens normaliter worden gebruikt om GvH na beenmergtransplantatie te voorkomen. De eerste voorwaarde die wordt toegepast is het gebruik van volledig compatibel beenmerg (bij inteelt proefdierstammen aangeduid als syngene of genetisch identiek beenmerg). De tweede voorwaarde is het gebruik van Cyclosporine A, een immunosuppressief geneesmiddel dat gebruikt wordt om orgaan-afstoting na transplantatie tegen te gaan, om verschillende autoimmuunziekten te onderdrukken en om een GvH-reactie na allogene beenmergtransplantatie te voorkomen.

Alhoewel de GvH-achtige ziekte in de Lewis rat overeenkomsten vertoont met klinische GvH bij de mens na beenmergtransplantatie, is de ziekte bij het proefdier niet het gevolg van incompatibiliteit in de transplantatie-antigenen, bepaald door de Major Histocompatibility Complex (MHC) en nonMHC antigenen. Er wordt immers gebruik gemaakt van syngene beenmergdonoren. In het rattemodel wordt de ziekte geïnduceerd door middel van een letale lichaamsbestraling van 8,5 Gy, een dag later gevolgd door syngene beenmergtransplantatie. Hierna worden de ratten behandeld met CsA gedurende 4 tot 6 weken. Ongeveer 2 weken nadat de CsA behandeling is gestaakt ontwikkelt zich de ziekte in de hiervoor gevoelige Lewis rattendstam. In het rattemodel kan syngene beenmergtransplantatie ook vervangen worden door



het afschermen van een van de achterpoten tijdens de bestraling. Hierdoor kan het beenmerg zich via het beschermde autologe beenmerg weer herstellen. Ook dan kan de ziekte weer ontstaan. Deze observaties hebben geleid tot twee conclusies. Ten eerste, de GvH-achtige ziekte in de rat is niet het gevolg van MHC of nonMHC antigen incompatibiliteit en heeft derhalve een autoimmuun karakter. Daarom is gekozen voor de naam Cyclosporine A (CsA) geïnduceerde autoimmunitet, kortweg CsA-AI. Deze naamgeving is echter ook niet geheel correct; CsA alleen, gegeven gedurende zes weken, induceert geen ziekte. Het is noodzakelijk dat de ratten vooraf worden geconditioneerd door letale bestraling. De tweede conclusie, en zoals wij zullen aantonen 'foute' conclusie, die werd getrokken was dat de thymus binnen het veld van bestraling moet liggen. Deze conclusie werd gestaafd door het feit dat CsA-AI afhankelijk is van de aanwezigheid van de thymus. Thymectomie, uitgevoerd voor bestraling en CsA behandeling, zal het ontstaan van CsA-AI verhinderen. Voorts is aangetoond door middel van transfer studies dat de effector cellen autoreactieve T cellen zijn, afkomstig uit de thymus. T cel transfer experimenten leveren alleen ziekte in de ontvanger als de ontvangers vooraf gedepleteerd worden van perifere, rijpe T cellen, hetzij door letale bestraling, hetzij door behandeling met Cyclophosphamide. Het is duidelijk dat voor de ontwikkeling van CsA-AI niet alleen autoreactieve, uit de thymus afkomstige T cellen nodig zijn, maar ook een modulatie (onderdrukking of verwijdering) van de regulerende perifere T cel populaties. In dit proefschrift worden de effecten beschreven die plaats vinden in de thymus en in de periferie in relatie tot het ontstaan van CsA-AI.

In **Hoofdstuk 2** vragen wij ons af op welk moment de autoreactieve T cellen de thymus verlaten. Om deze vraag te kunnen beantwoorden zijn gedurende de CsA behandeling thymectomien uitgevoerd in Lewis ratten die vooraf bestraald zijn met een dosis van 8,5 Gy, syngene beenmerg hebben gekregen en vervolgens behandeld werden met CsA gedurende maximaal 6 weken. De ratten die niet gethymectomeerd werden, ontwikkelden ongeveer 2 à 3 weken na de beëindiging van de CsA behandeling CsA-AI. Wanneer echter een thymectomie werd uitgevoerd binnen 8 dagen na de bestraling ontstond er geen ziekte. Thymectomiën uitgevoerd op dag 12 of later leidden wel tot het ontstaan van CsA-AI. Voorts bleek dat de incidentie en de mate van ernst van CsA-AI namen toe wanneer thymectomiën later werden uitgevoerd, met een maximale incidentie en ernst van vanaf 21 dagen. Dit betekent dat binnen 3 weken na bestraling de thymus alweer thymocyten bevat en dat autoreactieve T cellen gedurende de CsA behandeling de thymus verlaten en naar de periferie gaan. Vervolgens is de vraag gesteld of het bestralen van de thymus daadwerkelijk noodzakelijk is voor het induceren van CsA-AI. Hiervoor zijn Lewis ratten gethymectomeerd, vervolgens bestraald en voorzien van syngene beenmerg. Gelijktijdig met de beenmergtransplantatie zijn onbehandelde thymus lobjes, afkomstig van neonatale syngene ratten, onder het nierkapsel geplaatst. Wanneer deze

ratten vervolgens met CsA behandeld werden gedurende 4 tot 6 weken ontstond CsA-AI. Dit experiment toont aan dat de thymus nodig is, maar dat bestraling van de thymus zelf niet noodzakelijk is voor het ontstaan van ziekte.

Met het gegeven dat bestraling van de thymus niet nodig is om CsA-AI te induceren zijn we vervolgens in **Hoofdstuk 3** gaan kijken hoe CsA het ontstaan van autoreactieve, uit de thymus afkomstige T cellen induceert. Het is beschreven dat CsA interfereert met intrathymale selectie processen. In de literatuur is dit toegeschreven aan de afname van MHC klasse II antigenen op de dendritische cellen in de thymus, of aan de afname van de dendritische cellen zelf. Beide mechanismen zouden leiden tot het ontstaan van een aberrante negatieve selectie. Dit zou de verklaring kunnen zijn voor het ontstaan van perifere "verboden" T cellen ("verboden" in de zin van expressie van bepaalde variabele  $\beta$ -keten families (BV) van de T cel receptor (TCR)) zoals waargenomen in muizen behandeld met CsA. Om deze vraag te beantwoorden zijn Lewis ratten behandeld met CsA en/of 8,5 Gy bestraling. Het effect van de behandeling op het thymus stroma, inclusief de dendritische cellen, en het effect op de thymocyt populatie werd bepaald door middel van histologie, immunohistochemie en flowcytometrie. De thymocyt populatie kan worden onderverdeeld in corticale, relatief onrijpe CD4CD8 dubbel positieve (DP) TCR $\alpha\beta$  zwak positieve cellen (TCR $\alpha\beta^{\text{intermediate}}$ ), en medullaire, meer rijpe CD4 of CD8 enkel positieve (SP) cellen die TCR $\alpha\beta$  hoog positief (TCR $\alpha\beta^{\text{high}}$ ) zijn. 8,5 Gy bestraling in combinatie met syngene beenmergtransplantatie leidt in eerste instantie tot een depletie van thymocyten, echter de thymus is, in de zin van de bovengenoemde parameters, 2 weken na bestraling weer normaal. Een totaal ander beeld wordt echter waargenomen wanneer CsA behandeling (7,5 mg/kg per dag) wordt toegepast. CsA behandeling op zichzelf of in combinatie met bestraling en beenmergtransplantatie leidt tot een duidelijke afname van de grootte van de medulla in de thymus (involutie) en tot een afname van het aantal medullaire dendritische cellen. De expressie van MHC klasse II op de stromale cellen wordt echter niet beïnvloed; hoewel de medulla aanzienlijk afneemt in grootte blijft de verdeling en dichtheid van de antigeen expressie op het overblijvende medullaire epitheel en de dendritische cellen hetzelfde.

CsA behandeling leidt tevens tot een dramatische afname van de CD4 en CD8 SP thymocyten, wat wijst op een maturatie arrest van de onrijpere CD4CD8 DP thymocyten. De combinatie van bestraling met CsA behandeling verhindert niet het herstel van de corticale thymocyten in de thymus maar remt wel in sterke mate het herstel van de medullaire CD4 en CD8 SP TCR $\alpha\beta^{\text{high}}$  thymocyten. Deze observaties zijn in tegenspraak met de gedachte dat het bestaan van perifere autoreactieve, uit de thymus afkomstige T cellen het gevolg is van een veranderd micromilieu in de thymus medulla.

De vraag die hieruit volgt is of CsA de functie van de thymus dendritische cellen beïnvloedt. Die wordt behandeld in **Hoofdstuk 4**. Om deze vraag te kunnen beantwoorden zijn Lewis ratten behandeld met toenemende doses CsA (7,5; 15 en 30 mg/kg per dag) gedurende 2 weken. Vervolgens is het aantal dendritische cellen per thymus bepaald door de cellen te isoleren en is *in vitro* bepaald of deze cellen nog in staat zijn te functioneren als "accessory" cel of om allogene T cellen tot proliferatie aan te zetten. CsA behandeling leidt tot een dosis afhankelijke afname van het aantal geïsoleerde dendritische cellen. Deze geïsoleerde dendritische cellen wijken echter niet af van controle dendritische cellen voor wat betreft de expressie van membraan antigenen, de mate van "accessory" activiteit of het induceren van allogene T cel proliferatie in een zogenaamde "mixed leukocyt reaction". Deze resultaten zijn niet verenigbaar met het idee dat CsA selectief interfereert met thymus dendritische cellen. De resultaten ondersteunen daarentegen eerder de gedachte dat de medullaire involutie, inclusief de afname van de dendritische cellen, secundair het gevolg is van de sterke maturatie arrest van de corticale CD4CD8 DP thymocyten. Aangezien beschreven is dat de integriteit van de medulla afhangt van de aanwezigheid van rijpe thymocyten, is bij een afname van instroom van nieuwe, rijpe SP thymocyten in de medulla involutie van de medulla het gevolg.

Autoreactieve T cellen zijn klaarblijkelijk afkomstig van de thymus. Echter de behandeling met CsA op zich leidt niet tot het ontstaan van ziekte. Regulatorie perifere mechanismen spelen dan ook een belangrijke rol in het al dan niet ontstaan van CsA-AI, wat aangeeft dat CsA-AI in principe het gevolg is van een niet adequaat functionerend regulatorioir perifeer T cel circuit. Om dit aspect nader te onderzoeken zijn we van de thymus naar de periferie gegaan.

Perifere T helper (Th) cel-afhankelijke immuun responsen ontwikkelen zich in een Th1 of Th2 respons. Beide responsen worden functioneel onderscheiden op basis van de geproduceerde cytokines. De Th1 respons omvat de vertraagd type overgevoeligheidsreactie en wordt gekenmerkt door de productie van onder andere Interleukine (IL) 2 en Interferon (IFN)  $\gamma$ , terwijl de Th2 respons onder andere gebruik maakt van de cytokines IL4 en IL10 en betrokken is bij B cel hulp. Het is duidelijk geworden dat een overheersende Th2 respons in staat is om een Th1 respons te onderdrukken; het omgekeerde is eveneens het geval. Deze onderlinge remming wordt gestuurd door de geproduceerde cytokines. Verder is het idee geopperd dat in Th cel afhankelijke autoimmuun modellen een verschuiving van de perifere T cellen in het voordeel van Th2 cellen ziekte kan voorkomen, terwijl het tegenovergestelde juist autoimmuniteit kan veroorzaken of verergeren. In het CsA-AI model vertonen de huidlaesies histologisch karakteristieken van een vertraagd type overgevoeligheidsreactie en duiden op een Th1 respons.

In **Hoofdstuk 5** bestuderen we de thymus afhankelijke, perifere T cel rijping in relatie tot de ontwikkeling van CsA-AI. De hoeveelheid recente thymus emigranten (RTE) in de periferie, c.q. de mate van thymale productie, kan worden gemeten door het aantal Thy1.1+TCR $\alpha\beta$ <sup>high</sup> cellen te bepalen (Thy1.1-expressie is in de rat een kenmerk voor jonge T cellen die de thymus korter dan 14 dagen verlaten hebben). Bestraling leidt tot een volledig verdwijnen van perifere T cellen, hetgeen weer hersteld is 6 weken na de beenmergtransplantatie. CsA behandeling alleen resulteert uiteindelijk in een afname van het aantal RTE. Hetzelfde wordt ook waargenomen bij de combinatie van bestraling, beenmergtransplantatie en CsA behandeling. Deze combinatie leidt echter tot een ernstige remming van het herstel van de perifere T cel populatie tot aan het ontstaan van CsA-AI. Het aantal CD4 en CD8 T cellen is in gelijke mate afgenomen. In CsA-AI ratten worden cellen waargenomen die geen TCR $\alpha\beta$  tot expressie brengen maar wel CD4, CD8 of beide. De meerderheid van deze CD8<sup>+</sup> TCR $\alpha\beta$ <sup>-</sup> cellen bleken NK cellen te zijn, terwijl de CD4 en CD4CD8 DP TCR $\alpha\beta$ <sup>-</sup> cellen gekarakteriseerd zijn als monocytten.

Om meer te weten te komen over de verdeling van Th1 en Th2 cellen is gebruik gemaakt van de membraan markers CD45RC en RT6. Men veronderstelt dat in de rat Th1-achtige cellen CD45RC<sup>+</sup> zijn maar geen RT6 tot expressie brengen, terwijl Th2-achtige cellen juist geen CD45RC op het oppervlak hebben maar wel RT6. Lewis ratten die CsA-AI ontwikkelen, laten een duidelijke en blijvende toename, relatief ten opzichte van andere Th cellen, van rijpe Th1-achtige (CD45RC<sup>+</sup>, RT6<sup>-</sup>) cellen zien hetgeen leidt tot een omkering van de Th1:Th2 ratio in het voordeel van de Th1-achtige cellen. Wanneer gekeken wordt in Brown Norway ratten, die ongevoelig zijn voor de inductie van CsA-AI, dan valt op dat ten gevolge van bestraling en CsA behandeling de Th1:Th2 ratio niet omkeert in het voordeel van de Th1-achtige cellen. Deze omkering wordt ook niet waargenomen in Lewis ratten die alleen bestraald zijn of alleen met CsA behandeld zijn. Verder laten we in dit hoofdstuk zien dat normale Lewis CD45RC<sup>+</sup>, RT6<sup>-</sup> Th cellen in staat zijn om IL2 en, typisch voor alleen deze Th cellen, IFN $\gamma$  mRNA te produceren na *in vitro* stimulatie. Dit is een cytokine patroon karakteristiek voor Th1 cellen. Daarmee is voor deze fenotypisch gekarakteriseerde Th cellen aangetoond dat deze Th1 cellen zijn. Samenvattend wijzen deze bevindingen erop dat gevoeligheid, of juist ongevoeligheid, voor CsA-AI niet alleen afhangt van uit de thymus afkomstige autoreactieve T cellen, maar ook afhangt van een perifere verschuiving van de Th1:Th2 ratio in het voordeel van Th1.

In **Hoofdstuk 6** wordt gekeken naar de autoreactieve T cellen en het gebruik van het TCR BV repertoire door middel van adoptieve transfer studies. In de literatuur zijn tegenstrijdige resultaten beschreven, in die zin dat in adoptieve transfer studies CsA-AI kon worden overgebracht met alleen CD4 cellen, terwijl anderen juist rapporteerden dat CD8 cellen nodig

zijn, terwijl weer anderen meldden dat zowel CD4 als CD8 cellen nodig zijn voor een succesvolle overdracht van ziekte. Er is in ieder geval consensus dat de ontvanger geconditioneerd dient te worden met bestraling of Cyclophosphamide behandeling; adoptieve transfers met T cellen, geïsoleerd uit Lewis ratten met acute CsA-AI, naar normale Lewis ratten leidt nooit tot het ontstaan van ziekte. Het autoregulatorische T cel circuit van de ontvanger dient vooraf verwijderd te worden.

Om de efficiëntie te kunnen bepalen waarmee CD4 en CD8 T cellen ziekte kunnen overbrengen zijn adoptieve transfer studies uitgevoerd met een goed gedefinieerd protocol. Ontvanger ratten zijn vooraf eerst gethymectomeerd, vervolgens bestraald en voorzien van syngene beenmerg. Door deze behandeling wordt voorkomen dat na transfer de ingespoten T cellen gecontamineerd worden met nieuwe T cellen afkomstig van de thymus. Van Lewis ratten, met duidelijke klinische verschijnselen van acute CsA-AI, werden de mesenteriale, cervicale en axillaire lymfe knopen verzameld en verwerkt tot cel suspensies. Deze suspensies werden vervolgens *in vitro* gedepleteerd van CD4 of CD8 positieve cellen en daarna ingespoten in de geconditioneerde ontvanger ratten. De ontvangers van CD4 T cellen werden daarna behandeld met monoclonale antilichamen (mAb) die *in vivo* CD8<sup>+</sup> cellen depletteren; CD8 T cel ontvangers kregen CD4 depletende mAb toegediend. Na de transfer, op het moment van ziek worden, werden de doorgespoten T cellen bestudeerd; het perifere bloed met behulp van flowcytometrie en de huid biopsiën door middel van immunohistochemie. Zowel na de transfer van alleen CD4 als alleen CD8 T cellen ontwikkelde zich CsA-AI in de ontvanger ratten in de afwezigheid van de vooraf gedepleteerde T cel subset. De laesies die ontstaan na transfer van CD4 of CD8 T cellen zijn niet van elkaar te onderscheiden; niet in kinetiek noch in microscopische of macroscopische parameters die getoetst zijn. De geïnduceerde MHC klasse II expressie op keratinocyten en de aanwezigheid van ED1<sup>+</sup> macrofagen in CD4 en CD8 ontvangers was identiek aan die in de laesies zoals die waargenomen werden in donoren. Het enige waarneembare verschil was de aanwezigheid van CD4 én CD8 positieve TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> cellen in de donoren, terwijl in de ontvangers alleen CD4<sup>+</sup> TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> of alleen CD8<sup>+</sup> TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> aanwezig waren. Deze resultaten laten zien dat fenotypisch geheel verschillende T cel subsets vergelijkbare laesies kunnen veroorzaken: met andere woorden, er is een discrepantie tussen de veronderstelde fenotypisch gerelateerde functie en het werkelijke *in vivo* biologische effect. Hoe dit ontstaat is vooralsnog speculatief.

Verder is het TCR repertoire bepaald aan de hand van het TCR BV gebruik. Dit laat zien dat het TCR BV repertoire in de lymfe knopen van ratten met acute CsA-AI en de ontvangers in adoptieve transfer studies (die ziekte ontwikkelden in afwezigheid van hetzij CD4 hetzij CD8 T cellen) vergelijkbaar was met die van normale Lewis thymocyten of lymfe knoop cellen. Ook de epidermale T cel infiltraten in de ontvangers van de adoptief overgebrachte T cellen vertoonden geen preferentieel gebruik van TCR BV families. Deze resultaten ondersteunen niet

de gedachte dat CsA-AI het resultaat is van perifere expansie van T cellen in de zin van TCR BV gebruik.

Het werk zoals dat gepresenteerd is in deze hoofdstukken kan als volgt kort worden samengevat.

CsA-AI is het gevolg van een afwijkende T cel ontwikkeling na bestraling en CsA behandeling. CsA heeft een duidelijk effect op de thymus architectuur en thymocyt rijping: een afname van het aantal rijpe thymocyten en secundair hieraan een involutie van de medulla. Alhoewel alle stromale cellen aanwezig zijn en het aannemelijk is dat deze nog in staat zijn het micromilieu te vormen dat nodig is voor negatieve selectie, worden ten gevolge van de CsA behandeling autoreactieve T cellen gevormd. CsA heeft een direct effect op de thymocyten doordat CsA interfereert met het intra-cellulaire signaal dat volgt op activatie via de TCR en daardoor grijpt CsA in op het resultaat van de selectie van de thymocyten gedurende de rijping. Tengevolge van de verstoorde selectie zal uiteindelijk binnen de thymocyten die zowel de positieve als de negatieve selectie hebben overleefd de frequentie van autoreactieve thymocyten zijn toegenomen.

Bestraling is nodig voor het conditioneren van de periferie. Alleen wanneer de perifere regulatoire T cellen verwijderd zijn, kan CsA-AI ontwikkelen. Al tijdens de CsA behandeling zullen thymocyten uit de thymus naar de periferie migreren en nadat de CsA behandeling is gestaakt, zullen de autoreactieve T cellen CsA-AI veroorzaken. Autoreactieve T cellen zijn dan aantoonbaar in de lymfe knopen, de milt en in de laesies. Expansie van CD45RC<sup>+</sup>, RT6<sup>+</sup> Th1-achtige cellen is kritisch voor de ontwikkeling van CsA-AI. De activatie van de Th1-achtige cellen leidt tot productie van IL2 en IFN $\gamma$ , wat op zichzelf weer kan leiden tot een verdere verschuiving van andere T cellen, inclusief de CD8 T cellen, om op een gelijke wijze te reageren bij activatie. Op het moment dat de ziekte klinisch manifest is, zijn effector T cellen aantoonbaar binnen zowel de CD4 als de CD8 T cel subsets door middel van transfer studies. Er zijn geen aanwijzingen voor een beperkt TCR BV familie gebruik. Het antigeen in CsA-AI is onbekend maar zowel de CD4 als de CD8 T cellen zijn betrokken als effector T cel. Aangezien feitelijk alle Lewis ratten, na te zijn behandeld met bestraling en CsA, dezelfde ziekte ontwikkelen suggereert dit dat het (de) autoantigen(en) verband houdt met epitheliale antigenen die voorkomen in de thymus en in de huid.